

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
Please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(10) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-73422

(43) 公開日 平成8年(1996)3月19日

(51) Int. Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 C 323/12		7419-4H		
311/19		7419-4H		
G 0 1 N 33/50	Z			

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平6-214040

(71) 出願人 000141897

(22) 出願日 平成6年(1994)9月7日

株式会社京都第一科学
京都府京都市南区東九条西明田町57番地

(72) 発明者 井上 敏久
京都府京都市南区東九条西明田町57番地
株式会社京都第一科学内

(72) 発明者 小坂 秀子
京都府京都市南区東九条西明田町57番地
株式会社京都第一科学内

(72) 発明者 八木 雄次
京都府京都市南区東九条西明田町57番地
株式会社京都第一科学内

(74) 代理人 弁理士 青山 茂 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規アミノ酸エステルおよび白血球、エステラーゼ又はプロテアーゼの検出方法

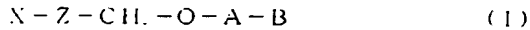
(57) 【要約】

【構成】 一般式： $X-Z-CH_2-O-A-B$ または
 $X'-(CH_2)_n-Z-CH_2-O-A-B$ [式中、Zは
酸素原子又は硫黄原子、Xは脂肪族炭化水素基、X'は
置換又は不置換の芳香族基又は複素環基若しくは炭化珪
素基、Aはアミノ酸又はペプチド化合物から誘導される
基、Bは基A中のアミノ基の保護基、nは0～8の整数
を示す。] で表されるアミノ酸エステル。このアミノ酸
エステルは、液体試料中の白血球、エステラーゼ又はプ
ロテアーゼの検出に用いることができる。

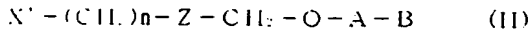
【効果】 このアミノ酸エステルを白血球、エステラー
ゼ又はプロテアーゼに作用させるとホルムアルデヒドが
発生する。このホルムアルデヒドを検出することによ
り、白血球、エステラーゼ又はプロテアーゼを検出でき
るので、測定自由度が増す。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式:



または



〔式中、Zは酸素原子又は硫黄原子、Xは脂肪族炭化水素基、X'は置換又は不置換の芳香族基又は複素環基若しくは炭化珪素基、Aはアミノ酸又はペプチド化合物から誘導される基、Bは基A中のアミノ基の保護基、nは0~8の整数を示す。〕で表されるアミノ酸エステル。

【請求項2】 基X'の置換基が、炭素数1~4の直鎖又は分岐アルキル基、アルコキシ基、フェニル基、ニトロ基、スルホン基、N-アシルアミノ基又はN,N-ジアルキルアミノ基である請求項1に記載のアミノ酸エステル。

【請求項3】 pH7.0~8.5のアルカリ性緩衝液の存在下、白血球、エステラーゼ又はプロテアーゼを含む液体試料に、請求項1又は2に記載のアミノ酸エステルを作用させ、発生したホルムアルデヒドを検出することを特徴とする白血球、エステラーゼ又はプロテアーゼの検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、新規なアミノ酸エステル、及び該アミノ酸エステルを使用する液体試料、特に尿中の白血球、エステラーゼ又はプロテアーゼを検出する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】腎臓及び泌尿生殖器の疾病を診断する場合、尿中白血球の検出・測定は非常に重要である。従来、尿中白血球の検出は、顕微鏡と血球測定板を用い、一定量の尿中に含まれる白血球の数を数えて行っていた。しかし、顕微鏡により白血球数を数える方法は、作業量が多いために時間がかかる上に、熟練者でなければ精度の高い計数が行えるとは言い難い。

【0003】顕微鏡による計数に代わる簡便且つ精度の良い方法として、白血球中に存在する「エステル分解活性」や、「蛋白質分解活性」を利用した方法が開発された。

例えば、特公昭61-45982号公報に記載の方法では、基質として置換フェノキシアミノ酸エステルを用い、白血球の作用で遊離した置換フェノールをジアゾニウム塩により検出する。特公昭62-41710号公報に記載の方法では、基質として5-フェニルピロールアミノ酸エステルを用い、白血球の作用で遊離した5-フェニルピロールをジアゾニウム塩により検出する。特公平2-43480号公報に記載の方法では、基質としてインドキシルアミノ酸エステルを用い、遊離したインドキシルをジアゾニウム塩により検出している。

【0004】上記の特許公報に記載の方法はいずれも、

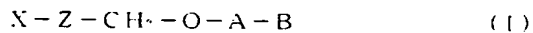
尿中白血球中に存在する「エステル分解活性」や、「蛋白質分解活性」を利用しているが、上記方法に用いられている各基質類はいずれも非常に高価であり、また、遊離してきた物質が、ジアゾニウム塩や分光光度計によってのみ検出可能であるので、検出手段の自由度が限られる。

【0005】

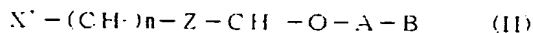
【発明が解決しようとする課題】本発明の第1の目的は、液体試料中の白血球、エステラーゼ又はプロテアーゼを検出するため、白血球、エステラーゼ又はプロテアーゼによって加水分解を受けて、検出可能な物質を遊離させる基質として有用な新規なアミノ酸エステルを提供することである。本発明の第2の目的は、そのような新規アミノ酸エステルを基質として使用する、白血球、エステラーゼ又はプロテアーゼの検出方法を提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決するため、本発明は、一般式:



または



〔式中、Zは酸素原子又は硫黄原子、Xは脂肪族炭化水素基、X'は置換又は不置換の芳香族基又は複素環基若しくは炭化珪素基、Aはアミノ酸又はペプチド化合物から誘導される基、Bは基A中のアミノ基の保護基を示す。〕で表されるアミノ酸エステル、及びpH7.0~8.5のアルカリ性緩衝液の存在下、白血球、エステラーゼ又はプロテアーゼを含む液体試料に、該アミノ酸エステルを作用させ、発生したホルムアルデヒドを検出することを特徴とする白血球、エステラーゼ又はプロテアーゼの検出方法を提供する。また、本方法では、検出するホルムアルデヒドを、既知濃度のホルムアルデヒドと発色の程度を比較することにより比色定量することが可能である。

【0007】式(I)及び(II)中、基Xの脂肪族炭化水素基は、一般に1~18個、好ましくは1~8個の炭素原子を有しており、例えばメチル基、エチル基、プロピル基、ベンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基などの基が挙げられる。

【0008】基X'の芳香族基又は複素環基の例としては、フェニル基、ベンジル基、ピリジン基、ナフチル基などが挙げられる。また、これらの基は、置換基により置換されていてもよく、置換基の例としては、炭素数1~4の直鎖又は分岐アルキル基、アルコキシ基、フェニル基、ニトロ基、スルホン基、N-アシルアミノ基、N,N-ジアルキルアミノ基が挙げられる。

【0009】炭化珪素基の例としては、(2-クロロメトキシエチル)-トリメチルシランが挙げられる。

【0010】基Aは、アミノ酸又はペプチド化合物から

誘導され、それらのカルボン酸部分において、 $-CH_2-$ の酸素原子とエステル結合を形成している。アミノ酸の例としては、L-アラニン、L-ロイシン、フェニルアラニン、バリン、イソロイシンが挙げられ、ペプチド化合物としては上記のアミノ酸が2~10個結合したオリゴペプチドが好ましく、例としてはL-アラニル-L-ロイシン等が挙げられる。

【0011】アミノ酸の保護基としては従来既知のものがいづれも使用できるが、好ましい保護基の例は、アセチル基、t-ブトキシカルボニル(BOC)基、トシル基、カルボベンゾキシ(CBZ)基、1-ジメチルアミノナフタレン-5-スルホニル(ダンシル)基である。

【0012】本発明のアミノ酸エチルを白血球を含む液体試料に作用させると、まず、式中の「O-A」部分のエステル結合が、白血球のエステラーゼ活性により加水分解され、「X-Z-CH₂-OH」又は「X'-(CH₂)_n-Z-CH₂-OH」と「HOOC-A'-B」(「OOC-A'=A」)とに分解される。次に、アルカリ性緩衝液の作用でアルカリ性条件下にすることで、「X-Z-CH₂-OH」又は「X'-(CH₂)_n-Z-CH₂-OH」の「Z-CH₂-」部分の結合が切られる。そうして、「X-Z-H」又は「X'-(CH₂)_n-Z-H」と「H-CHO」が遊離し、この「H-CHO」(ホルムアルデヒド、ホルマリン)を検出する。

【0013】アルカリ性緩衝液としては、クラーク-ルブス(Clark-Lubs)緩衝液、マッキルベイン(McIlvaine)緩衝液、セーレンセン(Sorensen)緩衝液、コルトフ(Kolthoff)緩衝液などが例示できる。このアルカリ性緩衝液は、白血球の酵素的反応や、エステラーゼ、プロテアーゼの活性を促進する働きもある。

【0014】ホルマリンの検出は、様々な既知の方法で行なえる。現在知られているホルマリンの検出方法としては、エミッヒ(Ernich)法、ナッシュ(Nash)法、グリオキシム法、エチレンジアミン法、ジメドン法、リミニ(Rimini)法、卵白鉄反応法、AOAC法(クロモトープ法、H₂O₂法及びKCN法)、亜硫酸ナトリウム*

*ム法、ジニトロフェニルヒドラゾン重畳法、MBTH法、ハンツシュ(Hantzsch)反応法、DABA蛍光法、DTAN蛍光法、DAN蛍光法、フクシン亜硫酸塩法、4-アミノ-3-ヒドラジノ-5-メルカプト-1,2,4-トリアゾール法、ペンタシアノアミン鉄塩-硫化水素法、プロピオンアルデヒド(3-フェニル-2-キノキサリニル)ヒドラゾン法、アゾベンゼン-p-フェニルヒドラジンスルホン酸法、2,3-ジメチル-2,3-ビス(ヒドロキシアミノ)ブタン法、ヒドロキシアミン塩酸塩試験法、p-フェニレンジアミンH₂O₂法、銀鏡反応法、アンジェリ(Angeli)反応法、ネスラー試薬法、テトラゾリウム塩試験法。感度の大小はあるものの、これらのいずれのホルマリン検出方法も、試料の状況及び目的に応じて使用できる。

【0015】

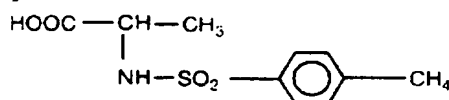
【実施例】以下、実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0016】アミノ酸エステルの合成

実施例1

N-トシル-L-アラニンの合成:

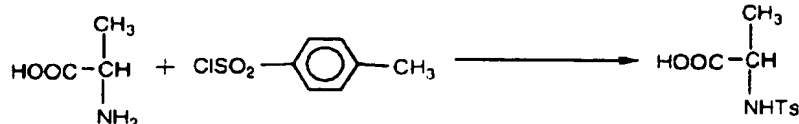
【化1】



【0017】L-アラニン11.5gを1N水酸化ナトリウム溶液260mlに溶解し、5℃以下に冷却した。溶液を攪拌しながら、p-トルエンスルホンクロリド25.0gをトルエン60mlに溶解した溶液を、5℃以上にならないように徐々に加え、室温下20時間攪拌した。反応液を水層とトルエン層とに分離し、水層を冷却しながら5N HClによりpH1.0にし、析出した白色結晶を濾取し、水洗して乾燥した。

【0018】

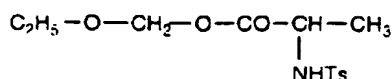
【化2】



Ts:トシル基

【0019】N-トシル-L-アラニルオキシメチルエチルエーテルの合成:

【化3】



【0020】ジメチルホルムアミド30mlに、N-トシル-L-アラニン2.5g及びトリエチルアミン1.1g

を加えて、30分攪拌した後、氷冷し、窒素気流下、クロロメチルエチルエーテル1.0gを滴下し、室温下18時間攪拌した。反応液にクロロホルム100mlを加え、水、飽和重曹水、飽和食塩水により順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮し、酢酸エチル-シリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して目的物を得た。

【0021】IR(neat) 3622(NH), 1744(C

5

6

¹H-NMR(CDCl₃): 1. 71 (t, CH-CH₂), 1. 10 (d, CHCH₃), 2. 40 (s, トシル基のMe), 3. 55 (q, CH-CH₂), 4. 01 (q, CH-Me), 5. 15 (d, CH₂), 5. 65 (d, CH₂), 7. 28, 7. 30, 7. 74, 7. 76 (Ph).

¹³C-NMR: 14. 9 (CH₂-CH₂), 19. 7 (CH*)

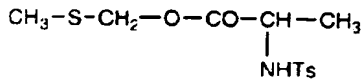
*-CH), 21. 5 (トシル基のMe), 51. 5 (CH-Me), 66. 2 (CH-CH₂), 90. 2 (CH), 127. 2, 129. 7, 136. 9, 143. 6, (Ph), 171. 9 (C=O).
【0022】
【化1】



【0023】実施例2

N-トシル-L-アラニルオキシメチルメチルスルフィドの合成:

【化5】



※クロロメチルメチルスルフィド1. 0gを滴下し、室温で18時間攪拌した。反応液にクロロホルム100mlを加え、水、飽和重曹水、飽和食塩水により順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮し、酢酸エチル-シリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して目的物を得た。融点15. 2~15. 8℃ (常温で液体)。

【0024】ジメチルホルムアミド30mlに、N-トシル-L-アラニン2. 5g及びトリエチルアミン1. 1gを加え、30分攪拌した後、氷冷し、窒素気流下、※

【0025】

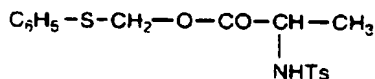
【化6】



【0026】実施例3

N-トシル-L-アラニルオキシメチルフェニルスルフィドの合成:

【化7】



★物を得た。

【0028】IR(neat) 3280 (NH), 1806 (C=O)

¹H-NMR(CDCl₃): 1. 55 (d, CH-CH₂), 2. 45 (s, トシル基のMe), 3. 99 (q, CH-Me), 5. 27 (d, CH₂), 5. 36 (d, CH₂), 7. 22-7. 80 (Ph, m, 9H).

¹³C-NMR: 16. 8 (CH-CH₂), 21. 7 (トシル基のMe), 53. 0 (CH-Me), 78. 4 (CH), 127. 7, 129. 0, 129. 1, 129. 7, 130. 5, 131. 5, 132. 5, 145. 5 (Ph, トシル), 172. 3 (C=O).

【0029】

【化8】

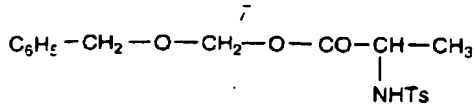
【0027】ジメチルホルムアミド30mlに、N-トシル-L-アラニン2. 5g及びトリエチルアミン1. 1gを加え、30分攪拌した後、氷冷し、窒素気流下、クロロメチルメチルスルフィド1. 6gを滴下し、室温で18時間攪拌した。反応液にクロロホルム100mlを加え、水、飽和重曹水、飽和食塩水により順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮し、酢酸エチル-シリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して目的物を得た。融点15. 2~15. 8℃ (常温で液体)。



【0030】実施例4

N-トシル-L-アラニルオキシメチルベンジルエーテルの合成:

【化9】



ジメチルホルムアミド30mlに、N-トシル-L-アラニン2.5g及びトリエチルアミン1.1gを加え、30分攪拌した後、氷冷し、窒素気流下、クロロメチルベンジエーテル1.6gを滴下し、室温下18時間攪拌した。反応液にクロロホルム100mlを加え、水、飽和重曹水、飽和食塩水により順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮し、酢酸エチル-シリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して目的物を得た。

【0031】IR(neat) 3554(NH), 1802(C*)

*O)

¹H-NMR(CDCl₃): 1.35(d, CH-CH₃), 2.34(s, トシル基のMe), 4.00(q, CH-Me), 4.55(CH), 5.20(CH), 7.24-7.76(Ph, m, 9H).

¹³C-NMR: 19.6(CH-CH₃), 21.5(トシル基のMe), 52.9(CH-Me), 72.0, 89.4(CH), 127.2, 127.6, 127.8, 128.1, 128.5, 129.7, 130.5, 136.5(Ph, トシル), 171.8(C=O).

【0032】

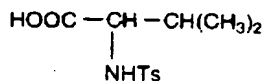
【化10】



【0033】実施例5

N-トシル-L-バリンの合成:

【化11】

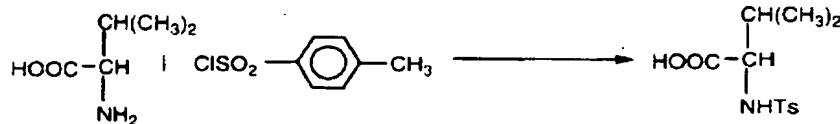


L-バリン15.2gを1N水酸化ナトリウム溶液260mlに溶解し、5℃以下に冷却した。溶液を攪拌しながら※

※ら、p-トルエンスルホンニルクロリド25.0gをトルエン60mlに溶解した溶液を、5℃以上にならないように徐々に加え、室温下20時間攪拌した。反応液を、水層とトルエン層とに分離し、水層を冷却しながら5N HClによりpH1.0にし、析出した白色結晶を濾取し、水洗して乾燥した。

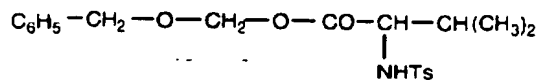
【0034】

【化12】



【0035】N-トシル-L-バリルオキシメチルベンジエーテルの合成:

【化13】

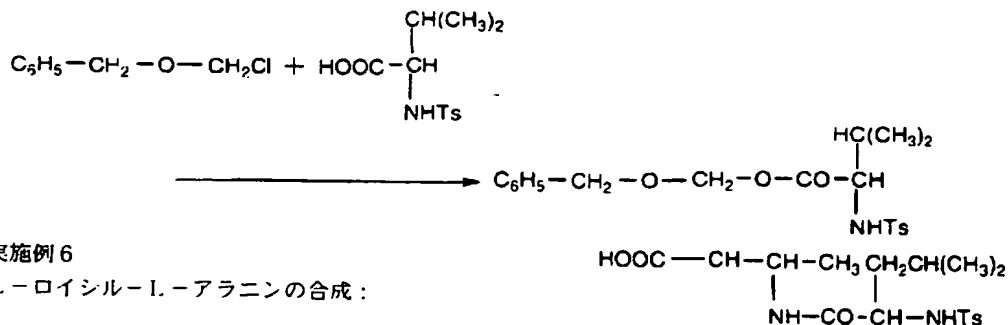


ジメチルホルムアミド30mlに、N-トシル-L-バリン2.7g及びトリエチルアミン1.1gを加え、30分攪拌した後、氷冷し、窒素気流下、クロロメチルベンジ★

★ルエーテル1.6gを滴下し、室温下18時間攪拌した。反応液にクロロホルム100mlを加え、水、飽和重曹水、飽和食塩水により順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮し、酢酸エチル-シリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して目的物を得た。融点73.8~75.2℃。

【0036】

【化14】



【0037】実施例6

N-トシル-L-ロイシル-L-アラニンの合成:

【化15】

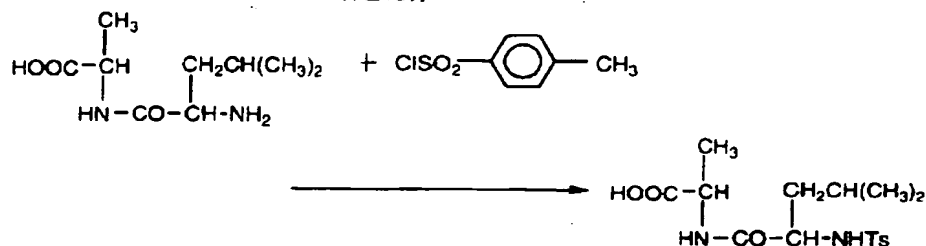
50 【0038】L-ロイシン-L-アラニン20.2gを

1N水酸化ナトリウム溶液260mlに溶解し、5℃以下に冷却した。溶液を攪拌しながら、p-トルエンスルホンニルクロリド25.0gをトルエン60mlに溶解した溶液を、5℃以上にならないように徐々に加え、室温下20時間攪拌した。反応液を、水層とトルエン層とに分*

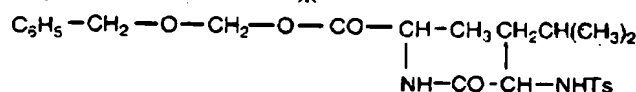
*離し、水層を冷却しながら5N HClによりpH1.0にし、析出した白色結晶を濾取し、水洗して乾燥した。

【0039】

【化16】



【0040】 N-トシル-L-ロイシル-L-アラニルオキシメチルベンジルエーテルの合成： ※【化17】



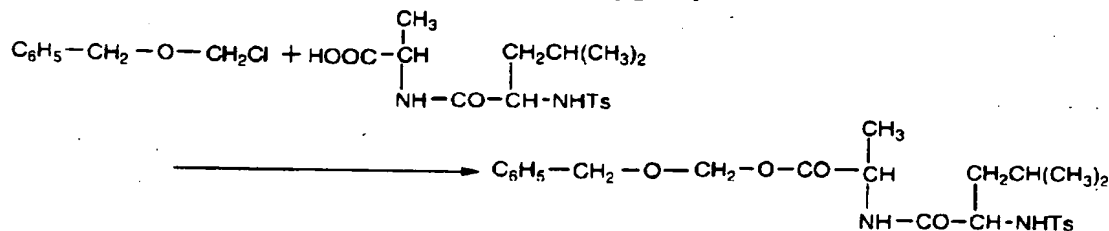
ジメチルホルムアミド30mlに、N-トシル-L-ロイシル-L-アラニン3.2g及びトリエチルアミン1.1gを加え、30分攪拌した後、氷冷し、窒素気流下、クロロメチルベンジルエーテル1.6gを滴下し、室温下18時間攪拌した。

★水、飽和食塩水により順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮し、酢酸エチル-シリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して目的物を得た。融点74.5~75.8℃。

【0041】

【化18】

反応液にクロロホルム100mlを加え、水、飽和重曹★



【0042】 実施例7

クロロメタンスルホン酸ナトリウムの合成：二口フラスコにメチレンクロライド19.4g、エタノール88cc、水32ccを加え、攪拌下、還流加熱した。水32ccに亜硫酸ナトリウム8.8gを溶解した液を、シリンジにて注入した。24時間反応後、反応液を、エバポレータにて濃縮し、白色結晶を得た。さらに、エタノール500ccを加え、2時間攪拌下、還流加熱した。熱時濾過し、濾液をエバポレータにて濃縮し、白色結晶クロロメタンスルホン酸ナトリウム(2.5g)を得た。

【0043】 フェノキシメタンスルホン酸ナトリウムの合成：ナスフラスコに、フェノール470mg、NaOH400mg、水400mgを加え攪拌する。その後クロロメタンスルホン酸ナトリウム870mgを加え、2時間200度にて還流加熱した。反応後、ベンゼンを加え濃縮し白色結晶を得た。真空ポンプにて完全に水分を除去し、フェノキシメタンスルホン酸ナトリウム(1100mg)を得た。

【0044】 フェノキシメチルクロリドの合成：ナスフ 50

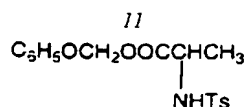
ラスコに、フェノキシメタンスルホン酸ナトリウム250mg、PCl₄495mgを加え攪拌した。1時間室温下反応後、POCl₃をエバポレータにて除去し、さらに、真空ポンプにて完全にPOCl₃を除去した。乾燥メチルクロリトリを加え、結晶を濾去し、濾液を減圧下、濃縮し、フェノキシメチルクロリド(180mg)を得た。

【0045】 N-トシル-L-アラニン(486mg)のジメチルホルムアミド溶液に、アルゴン気流下、攪拌下、氷冷下にて、60%油性水素ドナトリウム(124mg)を加えた。30分攪拌後、氷冷下、フェノキシメチルクロリド(284mg)を滴下し室温下18時間攪拌した。反応液に酢酸を加え中和後、メチルクロリトリにて希釈後、水、飽和重曹水、飽和食塩水にて洗い、硫酸マグネシウムで乾燥した。

メチルクロリトリを減圧濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィ(酢酸エチル)より精製して下記化合物を得た。

【0046】

【化19】



【0047】IR(neat) 3228(NH), 1801(C=O)

¹H-NMR(CDCl₃): 1.35(d, CH-CH₃), 2.37(s, トシル基のMe), 4.03(q, CH-Me), 5.60(dd, CH₂), 6.91-7.93(Ph, m, 9H).

¹³C-NMR: 19.6(CH-CH₃), 21.5(トシル基のMe), 51.4(CH-Me), 86.6(CH₂), 123.1, 127.0, 129.3, 129.6, 134.5, 146.1, 156.4, 165.4(Ph, tosyl), 171.3(C=O).

【0048】実施例8

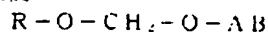
ホルマリン検出用試薬の調製

ホルマリン検出方法としてフクシン亜硫酸塩法を採用するホルマリン検出試薬用試薬(以下、「フクシン試薬」と言う。)を以下の通り調製した。塩基性フクシン0.2gを蒸留水150mlに加熱溶解し、冷却後、無水亜硫酸ナトリウム2.0gを蒸留水20mlに溶解したものを加え、10分間攪拌した後、濃塩酸2.0mlを加えて、更に30分間攪拌した。この溶液に活性炭を加えて濾過し、透明なフクシン亜硫酸塩水溶液を得た。この溶液のpHを水酸化ナトリウムで7.6に調整し、全量を水により200mlとした。

【0049】アルカリ性緩衝液の調製

Na₂B₄O₇・10H₂O 0.997gを100mlの蒸留

基質



実施例	R	A	B	試料溶液との反応性		
				白血球溶液	アミラーゼ溶液	ペプシン溶液
1	CH ₃ -O-	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{O}-\text{CO}-\text{CH}-\text{NH}- \end{array} $		○	○	○
2	CH ₃ -S-	"	"	○	○	○
3		"	"	○	○	○
4		"	"	○	○	○
5	"	$ \begin{array}{c} \text{CH}(\text{CH}_3)_2 \\ \\ -\text{O}-\text{CO}-\text{CH}-\text{NH}- \end{array} $	"	○	○	○
6	"	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{O}-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2 \\ \\ \text{HN}-\text{CO}-\text{CH}-\text{NH}- \end{array} $	"	○	○	○

○: 100ppm HCHO 溶液よりも濃く発色。

12

水に溶解したものに、0.1N HCl 47.8mlを加えて、全量を水により200mlとした。pHは7.6であった。この緩衝液を、以下「ボレート緩衝液」と言う。

【0050】化合物溶液の調製(以下、「基質溶液」と言う。)

実施例1~6で調製した各化合物10μmolをメタノール1.0mlに溶かし、これをボレート緩衝液2mlに溶かし、更にボレート緩衝液を加えて正確に10mlにした。

【0051】白血球、エステラーゼ又はプロテアーゼ溶液の調製(以下、「試料溶液」と言う。)

・白血球溶液: ボレート緩衝液中白血球200個/μl

・エステラーゼ溶液: ボレート緩衝液中ズブチリシン30mg/l

・プロテアーゼ溶液: ボレート緩衝液中プロティナーゼK30mg/l

【0052】対照用ホルマリン溶液の調製

ホルマリン濃度が、ボレート緩衝液中100ppmになる様に調製した。

【0053】活性測定方法

試験管にボレート緩衝液1.26mlと基質溶液0.70mlを入れ、十分に混合し、5分間37℃の恒温槽に入れた。ここへ、試料溶液0.02mlを加えて十分に混合し、3分後フクシン溶液0.02mlを加えて攪拌し、30秒後に色相を比較した。対照試験は、上記試料溶液の代わりに対照用ホルマリン溶液0.02mlを加える以外は、同様の手順で行った。結果を表1に示す

【0054】

【表1】

フロントページの続き

(72)発明者 阿知波 一雄

静岡県静岡市上谷町15-5